

Mindenekelőtt szeretném megköszönni az opponenseknek, hogy időt szántak arra, hogy értekezésemet elolvassák és értékeljék. Nagyon köszönöm mindhárom opponens elismerő szavait, ami nekem személyesen többet jelent a külföldön kapott elismerésnél. Köszönöm a kritikai megjegyzéseket és a feltett érdeklődő kérdéseket, melyekre az alábbiakban adom meg válaszaimat.

Válasz Dr. Homolya Lászlónak:

- 1.) *Biztosan lehet-e állást foglalni abban, hogy a csontvelőből származó sejtek megjelenése a központi idegrendszerben - idegi illetve vaszkuláris endotél sejtek formájában transzdifferentiáció eredményeképpen jön létre, vagy a csontvelőben esetlegesen jelenlévő, csekély számú pluripotens sejt hozza létre ezeket a sejteket. Elvileg elképzelhető vagy teljes bizonyossággal kizárható, hogy a csontvelő-átültetéssel a donorból szöveti (neurális és/vagy endoteliális) progenitor sejtek kerülnek a befogadó szervezetbe?*

Az tudomány mai állása szerint neurális őssejt nincs a csontvelőben, endotheliális őssejt van. Nem zárható ki, hogy a keringésből akár specifikus endotheliális őssejt akár más sejtek (pl. a kis embryonic-like keringő őssejtek) kerülnek be az idegrendszerbe és ezek alakulnak át helyi szöveti sejtekké.

- 2.) *A 2. sz. közleményben szereplő PU.1. knockout egérmodellben a donor eredetű neuronok egyenletes eloszlást mutattak, míg a 3. (4.?) sz. közleményben bemutatott, csontvelő transzplantáción átesett betegek mintáiban a donor eredetű sejtek csoportosan helyezkedtek el. Mi húzódhat meg e különbség hátterében?*

A különbségnek több oka lehet. Elsőként a species különbséget említeném – az egér ugyan jó modell állat igen sok biológiai folyamathoz, mégis jelentős különbségek vannak az egér és a humán idegrendszer fejlődése és funkciója között. A másik konkrét különbség, hogy a PU1 KO állatok gyakorlatilag fehérvérsejtvonal nélkül születnek és akkor kapják a csontvelőátültetést, amikor a vér-agy gát még éretlen és a központi idegrendszer sem fejezte be a fejlődést. A megvizsgált betegek esetében először is a primer betegség már bejuthatott az idegrendszerbe; másodszor a csontvelő transzplantációt besugárzás előzi meg, aminek számos hatása lehet az idegrendszerre, végül a betegek túlnyomó része felnőtt korban esik át a procedúrán, amikor az idegrendszer már sokkal kevésbé plasztikus.

- 3.) *Tudható-e hogy vajon a központi idegrendszerben megjelenő csontvelői eredetű idegi karaktereket mutató sejtek funkcionális kapcsolatban állnak a recipiens idegsejtjeivel?*

Ez egy igen fontos kérdés, amire azonban még nincsen válasz az irodalomban. Ennek legfőbb oka az, hogy technikailag igen nehéz elképzelni, hogyan lehetne előben azonosítani és funkcionálisan vizsgálni ezt az igen kevés számú sejtet.

- 4.) *Túl azon az alapvető fontosságú biológiai felfedezésen, hogy a keringésben lévő csontvelői eredetű sejtek átkerülhetnek a recipiens központi idegrendszerébe, felhasználható-e ez a viszonylag ritka jelenség a helyreállító orvoslásban vagy egyéb klinikai alkalmazásban? Ha igen, milyen klinikai tanulmányok indultak el a közlemények nyomán?*

Számos adat gyűlt össze és klinikai kipróbálások is mutatták, hogy injektált MSC-k specifikusan a sérült területekre migrálnak (hypoxiás, elhalt, gyulladt területek) ahol bioaktív termékeket szekretálva gyorsítani képesek a gyógyulási folyamatot. Ezt a funkciót különböző előkezelésekkel még fokozni is lehet (pl. hypoxiás kezeléssel a beadás előtt). Lassan egy évtizedes múlt bizonyítja, hogy az MSC beadásnak nincsen káros mellékhatása, ha a tenyésztés GMP körülmények között történik. Az MSC-kbe vírus vektorokkal (amik indukálható promoterekkel szabályozhatók) lehet a szükséges anyagot bejuttatni és így lokálisan a kívánt faktorokat lehet a sérülés helyére eljuttatni. Huntington kór esetében pl. a mutáns fehérje szintézisét kis interferáló RNS segítségével lehet legátolni, és ez állatkísérletekben szignifikánsan csökkentette a fehérje mennyiségét és a tüneteket is. Ez a fajta megközelítés (az MSC-k felhasználása faktorok gyártására) most van klinikai kipróbálás alatt biztonsági és hatásossági szempontból. Terápiás céllal eddig emberben ALS-ben használtak autológ MSC-t, amit tenyésztést követően CSF-be adtak be a thoracalis gerincvelőbe. A kezelt 7 betegből négyben a folyamat szignifikáns lassulását észlelték mellékhatások nélkül. Jelenleg 4 országban folyik klinikai kipróbálás MSC-k hatását vizsgálva szklerózis multiplexes betegekben (Anglia, Izrael, Spanyolország és USA). Egy másik kisebb tanulmányban traumás agysérülésben a sérülés helyére adott direkt MSC injekció után szignifikáns neurológiai javulást figyeltek meg 6 hónappal a beavatkozás után. Stroke-ban és Parkinson kórban is folynak kipróbálások biztató korai eredményekkel.

- 5.) *Az 5.sz. közleményben szereplő, és a 4. ábrán bemutatott kétszeresen transzgenikus egerek perifériális vérmintájában a CD45-re, illetve GFP-re nézve duplán pozitív sejtek aránya 85 %. Mi magyarázza, hogy az alkalmazott technika mellett nem az összes CD45+ sejt fejezi ki a GFP-t? Kizárható-e az ugyan kisebbségben, de mégis csak jelenlévő GFP+/CD45- sejtek szerepe a méhnyálkahártya szöveti regenerációjában?*

A technika alapja az, hogy azokban a sejtekben, ahol a CD45 promotor aktív (a fehérvérsejt vonal) a Cre-rekombináz enzim is expresszáldik és kimetszi a flox helyek közötti LacZ kazettát. Ennek következményeként a GFP protein szintézise felszabadul a Stop szignál alól és a GFP elkezd expresszáldni. Valószínűleg a sejtek egy bizonyos részében vagy nem termelődik elég Cre-rekombináz a kimetszéshez, vagy a GFP fluoreszcencia a detekciós limit alatt van. Ez lehet, hogy random történik, lehet, hogy bizonyos sejtpopulációban vagy bizonyos érettségi állapotban következik be. A CD45 molekula (más néven protein tyrosin phosphatase receptor type C) számos folyamat regulációjában szerepel, úgymint a sejt növekedés, differenciáció, vagy a sejtosztódás. Ha CD45+ sejtek a fejlődés folyamán benépesítik az uterus stromát, és a hám progenitoraiként ott maradnak,

valószínű, hogy leregulálják a CD45 markert, így a már egyszer “bekapcsolt” CD45 beindítja a GFP termelést, de ön maga már nem expresszál CD45-öt. Ez a populáció valószínűleg részt vesz a regenerációs folyamatban, hiszen az általunk megfigyelt zöld (GFP+) epithelium nem festődött CD45-re.

- 6.) *Ugyanebben a kísérlet sorozatban felvetették annak lehetőségét, hogy a keringésből származó, méhfalat repopuláló hámsejtek eloszlása, a GFP+ sejtek csomókban való elhelyezkedése klonális eredetről tanúskodik. Későbbi tanulmányok – esetleg lineage tracing technika alkalmazásával – igazolták-e ezt a feltételezést?*

Nem végeztünk további tanulmányokat ezen az egéren, mivel rendkívül nehéz volt tenyészteni őket.

- 7.) *Az előbb említett tanulmányban kidolgozott, rendkívül ötletes állatmodell lehetőséget kínál nemcsak a méhnyálkahártya megújításának, hanem más hámszövetek regenerációjának vizsgálatára is. Vajon a bemutatott modellállat többi, magas forgási sebességű hámszöveteiben (pl. bélhám, légúti epithelium) szintén megjelennek-e a hematopoetikus eredetű (CD45+) sejtek?*

Előzetes megfigyeléseink szerint a szájnyálkahártyában is és a gasztrointesztinális traktusban is láttunk hasonló GFP+ területeket, de (amint a 6. pontban említettem) tenyésztési nehézségek miatt abbahagytuk ezeket a kísérleteket.

- 8.) *Szintén egy marginális, az értekezés szerkesztésével kapcsolatos megjegyzés, hogy szerencsésnek tartottam volna, hogy ha a 8. közlemény eredményeinek bemutatásánál bekerült volna az értekezésbe a cikk 6. ábráján túl az 5. ábra – legalább részben, hiszen ezen az ábrán szerepel a prosztaglandin E₂ szekréció, amely egy igen lényeges eleme a közleményben bemutatott eredményeknek. Ezzel a kísérlet sorozattal kapcsolatban azonban felmerült bennem egy konkrét kérdés is. A csontvelői eredetű őssejtek és makrofágok ko-kultúrájában a kontrollhoz képest kb. 3-szoros PGE₂ szekréciót lehet tapasztalni. A TLR4 knockout csontvelői eredetű őssejtek esetében – a többi vizsgált kondícióval ellentétben – a PGE₂ szint nem csökken le a teljesen a kontroll szintre, az 5 órás pontnál annak kb. 1,5-szerese marad. Ezzel szemben a makrofágok interleukin-10 szekréciójában nem található ez a különbség. Milyen magyarázat adható erre a megfigyelésre?*

Nagyon valószínű, hogy a TLR4/MyD88 receptor stimulálásán kívül más bejövő szignálok (pl. TNF-alpha) is befolyásolják az MSC PGE2 produkcióját. Emiatt ha a TLR4 utat blokkoljuk is, más stimulusok még képesek lehetnek emelkedett PGE2 termelés kiváltására. Az pedig, hogy a TLR4-Myd88 út blokkolása teljesen megszünteti az MSC IL-10 emelő hatását arra utal, hogy a bejövő LPS stimulus valószínűleg más IL-10 szekrécióért felelős szignáltranszdukciós utakat is beindít, és nem kizárólagosan PGE2 dependens (nitrogen monoxidnak lehet például szerepe).